

# イノシトール燐酸/カルシウム系に共役するグルタミン酸受容体mGluR5の分子生物学的解析

著者	阿部 高明
号	1129
発行年	1992
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/20633">http://hdl.handle.net/10097/20633</a>

あ べ たか あき  
阿 部 高 明

博 士 ( 医 学 )

医 博 第 1 1 2 9 号

平成 4 年 3 月 27 日

学位規則第 4 条第 1 項該当

東北大学大学院医学研究科  
(博士課程) 病態科学系専攻

Molecular Characterization of A Novel  
Metabotropic Glutamate Receptor mGluR5  
Coupled to Inositol Phosphate/ $\text{Ca}^{2+}$  Signal  
Transduction  
(イノシトールリン酸/カルシウム系に共役する  
グルタミン酸受容体 mGluR 5 の分子生物学的  
解析)

(主 查)

教授 阿 部 圭 志      教授 成 澤 邦 明

教授 柴原茂樹

# 論文内容要旨

## 【緒言】

グルタミン酸は中枢神経に於ける主要な興奮性刺激伝達物質であり、記憶の獲得や多くの神経変性疾患に関与していることが知られている。その受容体はチャンネル型のイオノロトピック受容体（AMPA/kainate 受容体並びに NMDA 受容体）と G 蛋白を介するメタボトロピック型受容体に区別される。現在までの研究によりメタボトロピック型受容体にはイノシトールリン酸/ $\text{Ca}^{2+}$  系に共役するものとしらないものがあることがそれら受容体の cDNA クローニングより明らかにされた。本研究に於いては、メタボトロピック型受容体のうちイノシトールリン酸/ $\text{Ca}^{2+}$  系にカップルする新たなグルタミン酸受容体サブタイプ cDNA の単離とその構造決定、並びにその機能をアフリカツメガエル卵母細胞及び哺乳動物細胞発現系を用いて解析し、更にその脳内での分布を詳細に検討した。

## 【方法】

現在までにクローニングされている 4 種類のメタボトロピック型グルタミン酸受容体 cDNA 間で共通に保存されている領域のオリゴプライマーを合成し 6 週令 SD ラット全脳 RNA をテンプレートとして PCR を行った。得られたフラグメントのうちイノシトールリン酸/ $\text{Ca}^{2+}$  系グルタミン酸受容体とホモロジーのあるものをプローブとして SD ラット全脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングし新たな cDNA クローンを単離した。得られたクローンを用いて in vitro RNA を合成しアフリカツメガエル卵母細胞に注入発現させその電気生理学的活性を測定した。また cDNA を Chinese Hamster Ovary cell (CHO 細胞) にカルシウムリン酸法で transfection し受容体発現細胞を確立し、その細胞系を用いてリガンドの作用をカルシウム顕微鏡並びにイノシトールリン酸の産生測定で検討した。mRNA の発現はノザンプロット及び in situ ハイブリダイゼーションを用いて検討した。

## 【結果】

本研究により得られた結果は以下の通りである。

1. 得られたクローン（以下 mGluR 5）は RNA サイズでは 8.5kb で、そのコーディング領域は 1171 アミノ酸からなり 7 回の膜貫通領域を持つ構造を示した。現在知られてるイノシトールリン酸/ $\text{Ca}^{2+}$  系に共役するメタボトロピック型グルタミン酸受容体（以下 mGluR 1）とは全 cDNA で 60.8% と高いホモロジーを示した。

2. アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた mGluR 5 はグルタミン酸のアゴニストであるグルタミン酸、イボテン酸, trans-ACPD に対して電気生理学的反応を示し、機能的であることが確認された。

3. mGluR 5 を発現する CHO 細胞に 1 mM のグルタミン酸を投与しカルシウム顕微鏡で細胞内カルシウム濃度を測定したところグルタミン酸によって細胞内カルシウムが著明に増加しこの増加は細胞外液のカルシウムを除いても認められた。

4. この細胞を用いて各種アゴニストのイノシトール燐酸の産生における用量-反応曲線を調べたところキスカル酸, グルタミン酸, イボテン酸, trans-ACPD の EC<sub>50</sub>値は  $3 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M であった。

5. アンタゴニストである AP 3 並びに AP 4 は効果がなかった。

6. PTX に対する感受性は15%と mGluR 1 に比較して弱く、異なる G 蛋白とカップルする可能性を示唆した。

7. ノザンプロットでは8.5Kb のシングルバンドが検出された。in situ ハイブリダイゼーションより、mGluR 1 受容体は小脳プルキンエ細胞, 海馬 (CA 2 - CA 4), 嗅球 (tufted cell, mitral cell) 等に分布しているのに対して、mGluR 5 受容体は、海馬 (CA 1 - CA 4), subiculum, 線条体, 大脳皮質, 嗅球 (internal granule cell) に多く発現しており小脳では Golgi 細胞の一部にのみ発現が見られた。

## 【考 察】

グルタミン酸の生体に於ける機能を理解する上でその受容機構の解析は必須であり特に受容体の構造を明らかにすることは重要と考えられる。本研究はイノシトール燐酸/ $\text{Ca}^{2+}$  系にカップルする新たなメタボトロピック型グルタミン酸受容体の構造とその機能を明らかにした。新たに得られた cDNA クローンの構造は他のメタボトロピック型グルタミン酸受容体と同様高度に保存されていた。その薬理学的特徴は mGluR 1 と類似していたが PTX 感受性や cAMP の反応が異なり、また脳内での分布が明確に異なり、別のタイプの受容体であることが本研究で明らかになった。以上の結果はグルタミン酸受容体の中枢神経系に於ける極めて多様な機能を考える上で重要な情報を与えるものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

グルタミン酸は中枢神経における主な興奮性刺激伝達物質であり、記憶の獲得や学習などの機能やてんかん、脳卒中などの神経疾患に関与していることが知られている。その受容体はチャンネル型のイオントロピック型受容体と G 蛋白を介するメタボトロピック型受容体に区別されている。

阿部高明はメタボトロピック型受容体のうちイノシトールリン酸/ $\text{Ca}^{2+}$ 系にカップルする新たなグルタミン酸受容体サブタイプの分子生物学的研究を行ない、以下の成績を明らかにした。

1. メタボトロピック型グルタミン酸受容体には、現在までにクローニングされている mGluR 1～4 のほかに、新たなサブタイプ mGluR 5 が存在する。2. そのサブタイプ受容体は 1171 アミノ酸からなり、RNA サイズは 8.5 キロであった。その構造は他のグルタミン酸受容体とよく似ており、特に mGluR 1 とのホモロジーは 60.8% と高かったが、他の G 蛋白とカップルする受容体との間にはホモロジーは認められなかった。3. アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的検討並びに哺乳動物細胞 (CHO 細胞) 発現系のイノシトールリン酸と  $\text{Ca}^{2+}$  の実験結果より、この受容体はイノシトールリン酸/ $\text{Ca}^{2+}$ 系にカップルすることが明らかにされた。4. この受容体のアゴニスト活性は quisqualate > ibotenate > glutamate となり、またアンタゴニストの AP 3, AP 4 は効果が無いことから、mGluR 5 は mGluR 1 と同じ quisqualate 型と考えられた。5. mGluR 1 と mGluR 5 は百日咳毒素によるリガンドの反応の抑制の程度並びに cAMP 産生に差異があり、細胞内情報伝達系が異なる可能性が示された。6. mGluR 5 の mRNA はノザンプロット並びに in situ ハイブリダイゼーションから線条体、海馬、大脳皮質、嗅球に多く、小脳には少ないことを明らかにした。

以上の研究成績は、mGluR 5 受容体が中枢神経における極めて多様な機能に関与するグルタミン酸受容体の中で重要な役割を果たしていることを示唆するもので、本研究は学位授与に十分値するものである。